

Poly-N-acetyl-glucosamine이 당뇨병 쥐에서 창상치료에 미치는 영향

양호직 · 윤치선

을지대학교 의과대학 성형외과학교실

Effects of Poly-N-acetyl Glucosamine(pGlcNAc) Patch on Wound Healing in db/db Mouse

Ho Jik Yang, M.D., Chi Sun Yoon, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

Purpose: Poly-N-acetyl glucosamine(PGlcNAc) nanofiber-based materials, produced by a marine microalga, have been characterized as effective hemostatic and angiogenic agents. The similarity between PGlcNAc patch and the natural extracellular matrix allows it to support new healthy tissue growth in an injured area and to encourage fluid absorption. In this study, we hypothesized that a poly-N-acetyl glucosamine fiber patch(PGlcNAc patch) may enhance wound healing in the db/db mouse.

Methods: PGlcNAc patches were applied on one square centimeter, full-thickness, skin wounds in the db/db mouse model. Wounds(n=15 per group) were dressed with a PGlcNAc nanofiber patch for 1 hour(1 h), 24 hours(24 h) or left untreated(NT). After the application time, patches were removed and wounds were allowed to heal spontaneously. The rate of wound closure was evaluated by digital analysis of unclosed wound area in course of time. At day 10, wounds(n = 7 per group) were harvested and quantified with immunohistochemical markers of proliferation(Ki-67) and vascularization (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1).

Results: Wounds dressed with PGlcNAc patches for 1 hour closed faster than control wounds, reaching 90% closure in 16.6 days, nine days faster than untreated wounds. Granulation tissue showed higher levels of proliferation and vascularization following 1 h treatment than the 24 h and NT groups. In addition to its hemostatic properties, the PGlcNAc material also appears to accelerate wound closure in healing-impaired genetically

diabetic mice.

Conclusion: This material, with its combination of hemostatic and wound healing properties, has the potential to be effective agent for the treatment of complicated wounds.

Key Words: Glucosamine, Wound healing, PGlcNAc

I. 서론

진단 도구와 치료기술의 발전으로 심장질환, 암, 그리고 뇌졸중의 이환율은 감소하였으나 당뇨와 고령 인구의 증가는 상처치료의 중요한 과제가 되고 있다.¹⁻³ 복잡한 상처를 치료하기 위하여 현재 사용하는 방법은 미세한 물리적 힘을 통해 새로운 조직의 성장을 촉진하는 Vacuum Assisted Closure Device(VACTM, Kinetics Corporation Inc., San Antonio, TX)이다. VAC 장치는 상처치료에 효과적이지만^{4,5} 출혈중인 상처에 적용되었을 때 상당한 실패 가능성이 있어 제한적으로 사용되고 있다. 당뇨병을 지닌 고령의 환자들은 상처치료가 어렵고 항응고제를 복용하는 경우가 많으며 응고 요소들이 정상 수준으로 측정되더라도 상당한 출혈이 유발되어 상처가 악화되기도 하므로 지혈과 상처치료를 동시에 할 수 있는 치료법이 필요하다.

N-acetyl glucosamine을 지닌 소당류와 다당류는 진피에 풍부하게 존재하는 glycosaminoglycan으로서 수술 후 유착 방지나 관절통의 경감을 위해 쓰이거나 재건수술 분야에서 피부 대체재로 사용되고 있다.^{6,8} 해양 미세조류의 배양을 통하여 높은 동질성을 가진 poly-N-acetyl glucosamine(PGlcNAc) 나노섬유를 추출할 수 있으며 PGlcNAc 패치(SyvekPatchTM, Marine Polymer Technologies, Danvers, MA)는 지혈능력이 뛰어나 중재적 심장학과 방사선학적 영역에서 도관 제거 후 비침습적 상처폐쇄를 위해 사용되기도 한다.⁹ PGlcNAc 나노섬유의 지혈 및 상처치료는 혈소판, 적혈구 및 내피세포와 상호작용을 통하여 이루어지고 특히 혈소판과의 상호작용을 통해 혈소판의 활성화를 증폭시킨다.¹⁰ 활성화된 혈소판은 위축형성, 신장(extension), 형태변

Received January 2, 2008

Revised February 19, 2008

Address Correspondence: Ho Jik Yang, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Eulji University, Dunsan-dong, Su-gu, Daejeon 302-799, Korea. Tel: (042) 611-3029 / Fax: (042) 259-1111 / E-mail: drhjiyang@yahoo.co.kr

화, integrin 복합체 활성화, 칼슘 신호전달의 활성화, 세포막 표면의 phosphatidyl serine기 노출, 혈소판에 factor X의 결합, 섬유소 중합체 반응 등을 촉진하고 상처 부위에서 성장인자를 방출함으로써 혈관생성과 혈관 성숙을 조절하여 상처치유를 돕는다.¹⁰⁻¹²

본 교실에서는 당뇨병 쥐 모델을 이용하여 전층 상처(full-thickness wound)에 PGlcNAc 패치를 적용함으로써 상처치유를 촉진시킬 수 있다고 생각하여 본 연구를 기획하였다.

I. 서 론

가. PGlcNAc 패치의 준비

PGlcNAc 패치를 구성하는 미세조류의 나노섬유는 Marine Polymer Technologies, Inc.에서 특허받은 cGMP 가공법을 통해 생산된다. 특수 성장 배지에서 미세조류를 배양하며 배양된 미세조류를 채취하여 단계적 분리와 정제 과정을 통해 PGlcNAc 나노섬유를 추출한다. 농축과정과 오븐 건조과정을 거쳐 패치 형태로 가공한 뒤 γ -방사선으로 멸균한다. 나노섬유 1개의 크기는 평균 $2\text{ nm} \times 0.2\text{ nm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ 이다. 나노 섬유 다발은 물리화학적인 검정 기준과 엄격한 순도 기준에 부합되어야 하며 최종적으로 단백질이나 금속이온과 같은 불순물이 없는 상태로 반출된다.

나. 상처 모형과 연구설계

유전적으로 당뇨병을 지닌 동종의 8-12주된 수컷 쥐(C57BL/KsJ-Leprdb)를 각 그룹마다 15마리씩 사용하였다. 수술 전날 제모를 시행하였으며 수술 당일에 쥐의 무게를 측정하고 Nembutal(Pentobarbital)로 마취한 후 등 쪽에서 피부와 피하근육층을 1 cm^2 크기로 절제하였다. 상처를 1시간(1 hr group)과 24시간(24 hr group)동안 PGlcNAc 패치로 덮은 그룹과 PGlcNAc 패치를 덮지 않은 그룹(NT group)으로 구분하였으며 모든 상처에는 테가덤(Tegaderm, 3M, St. Paul, MN)을 부착하였다. 수술 후 10일과 21일에 각 그룹에서 각각 7-8마리의 쥐를 안락사 시키고 상처 부위를 촬영한 후 절제하였다. 절제한 상처조직은 10% neural-buffered formalin 용액으로 고정하였다.

다. 상처폐쇄(Wound closure) 분석

치료방법을 알지 못하는 세 명의 관찰자들에게 면적측정의 방법으로 상처를 비교하게 하였다. 상처는 수축(contraction, C), 재상피화(re-epithelialization, E), 그리고 열린 상처(open wound, O)로 표시되었으며

처음의 상처면적에 대한 백분율로 정량화하였다(Fig. 1). 상처 중앙 부위를 횡단면으로 잘라 파라핀에 고정하고, 절편으로 잘라 hamatoxylin & eosin(H&E) 염색을 시행하였다. Adobe Photoshop CS Software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA)를 사용하여 횡단면으로 잘린 상처 절편을 디지털 영상으로 만들고 디지털 면적측정법(Image J, NIH, Bethesda, MD)으로 육아조직이 있는 지역의 면적과 두께를 분석하였다.

라. 면역조직화학법

파라핀에 고정된 상처단면을 재수화(re-hydration)시키고 10 mM sodium citrate(pH 6.0)에서 10분 동안 초고주파(microwave)를 통과시켜 Ki67 항원을 복원시켰다. 동결 절편을 아세톤으로 고정하고 PECAM-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1)에 대한 염색을 시행하였다. PECAM-1(Pharmingen, San Jose, CA)에 대한 항체는 4°C에서 하룻밤 동안 배양하고 Ki67(LabVision, Fremont, Ca) 항체는 상온에서 1시간 동안 배양하였다. Tyramide 증폭 시스템(Perkin Elmer, Boston, MA)을 사용하여 PECAM-1 신호를 증폭시켰다.

마. 혈관밀도 정량화

상처에서 PECAM-1에 양성인 부분의 대조를 강화시키기 위해 CorelPhotopaint v.10의 color mask 기능을 이용하여 PECAM-1에 양성인 부분을 어둡게 처리하여 혈관들은 검정색으로 관찰되고 배경은 흰색으로 관찰되도록 하였다. IP Lab software의 segmentation 기능을 이용하여 흑백으로 처리된 부분들을 정량화하고 비교하였다. 가공처리한 사진에 H&E 염색 사진을 투사시켜 상처조직을 구분하였고, 전체 육아조직에 대한 혈관의 비로 혈관의 밀도를 정량화하였다. 광학현미경으로 (20×) 4-7개의 시야를 관찰하여 상처의 치료방법에 따

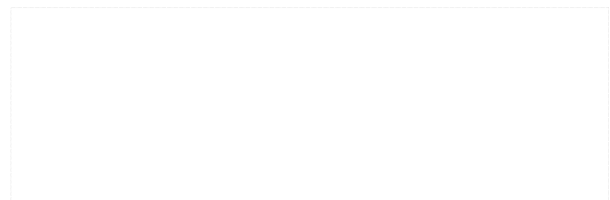


Fig. 1. Wound closure analysis. Standardized photographs were taken on the day of wounding and twice a week during the follow up. Wound contraction, re-epithelialization and raw surface were studied as a percent of initial wound area.

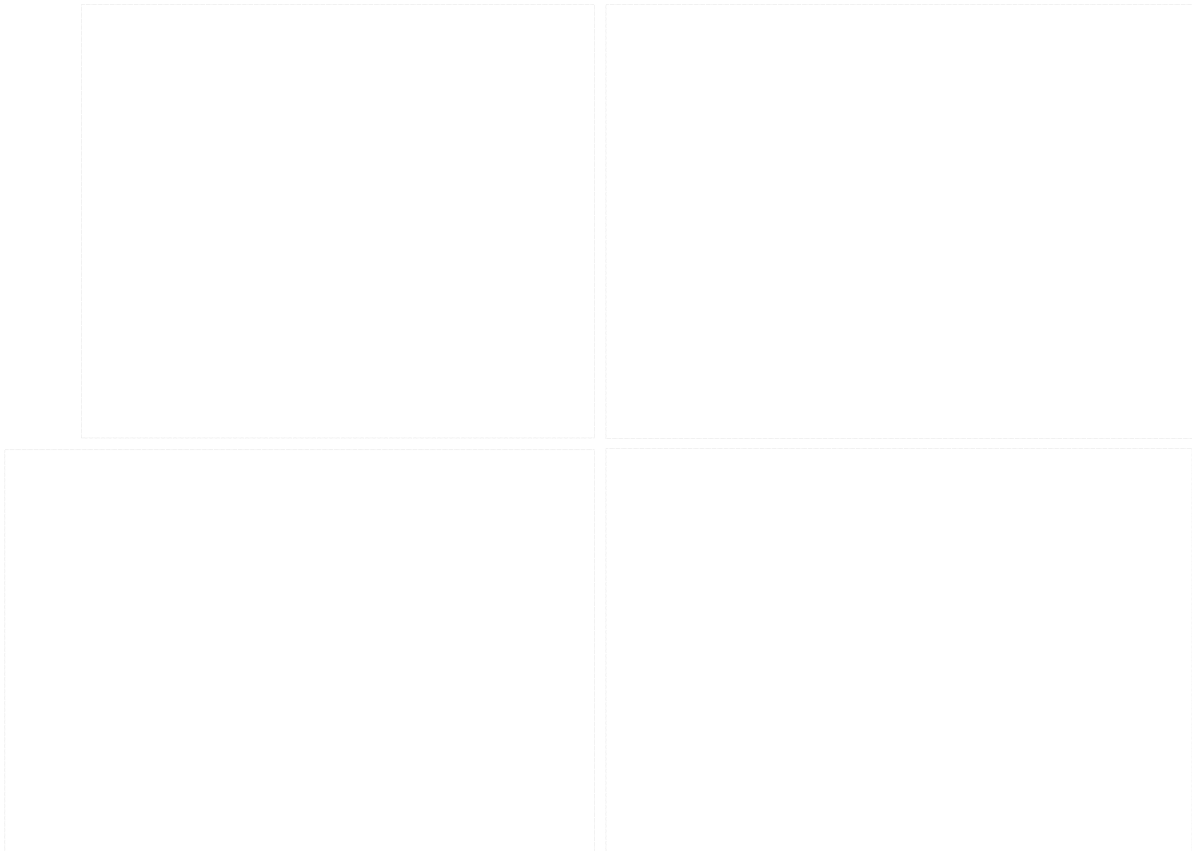


Fig. 2. (Above, left) Digital images at day 4, day 10, and day 14. (Above, right) At day 10, treated group showed higher rate of re-epithelialization compared to NT group, particularly in 1 hour group. (Below, left) Day when wounds untreated or treated with PGlcNAc patch for 1 hour and 24 hours reached 90% closure. (Below, right) Wound area(%) through days, treated groups showed faster wound closure than NT group.

른 혈관밀도 차이를 검사하였다.

바. 세포증식의 정량화

혈관밀도 정량화와 유사한 방식으로 Ki67로 염색된 절편의 영상 분석을 통해 세포증식의 정도를 정량화하였다. 상처 절편의 고해상도 디지털 이미지에서 전체 핵에 대한 Ki67 양성 세포의 비를 측정하였다(Fig. 3). 광학현미경으로(20×) 4-6개의 시야를 관찰하여 전체 세포핵에 대한 증식 과정중인 세포핵(Ki67 양성)의 비로 세포증식 정도를 정량화하였다.

사. 통계적 분석

측정값들은 본문과 그림에서 평균 ± 표준편차로 표현하였고 치료방법의 유의성과 차이점을 비교하기 위해 일원변량분석과 LSD 검정을 이용하였다. 다변량 분석은 Statistica v7.0(Statsoft, Inc, Tulsa, KU)을 사용하였다.

III. 결 과

PGlcNAc 패치를 사용하여 치료한 집단은 치료하지 않은 집단과 비교하였을 때, 시간이 경과함에 따라 더 빠른 상처폐쇄를 유도한다. 1시간 동안 PGlcNAc 패치를 적용한 그룹은 NT 그룹에 비하여 더 빠르게($p < 0.01$) 상처 크기가 감소하였고(Fig. 2) 평균적으로 16.6일에 전체 상처의 90%가 폐쇄되어 NT 그룹의 25.6일에 비하여 9일 더 빠른($p < 0.01$) 상처 폐쇄를 보였다. 24시간 동안 PGlcNAc 패치를 적용한 상처는 평균적으로 18.2일에 상처의 90%가 폐쇄되었다(Fig. 2). 1시간 그룹과 24시간 그룹은 NT 그룹에 비해 재상피화가 증가($p < 0.01$)하였다(Fig. 2). PGlcNAc 패치를 적용한 그룹이 NT 그룹에 비하여 상처수축이 작게 관찰되었으며 특히, 1시간 그룹에서 가장 작았다(Fig. 2).

PGlcNAc은 혈관 밀도 증가와 증식을 유발한다. 당뇨병 쥐에서 아무 처리도 하지 않은 1 cm² 크기의 전층 상처는 수술 후 8-12일 사이에 50% 폐쇄되었다. 상처

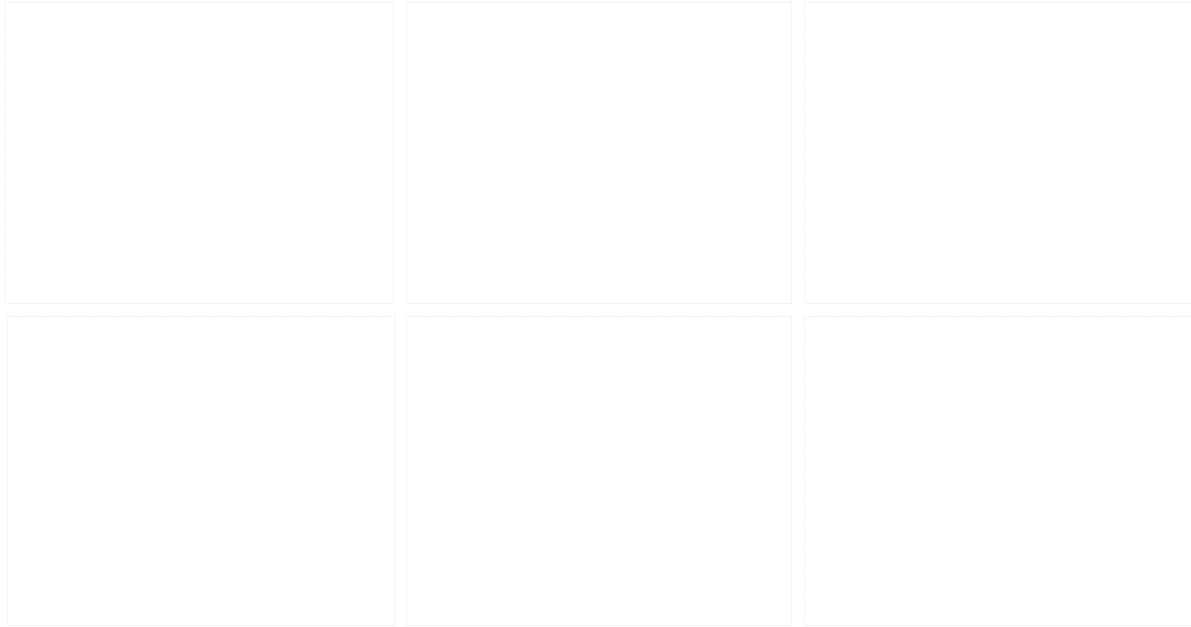


Fig. 3. (Above) Ten days after wounding, wounds were harvested and immunohistochemical markers for proliferation(Ki-67) were quantified to stage wound healing. (Below) Ten days after wounding, wounds were harvested and immunohistochemical markers for vascularity(PECAM-1) were quantified to stage wound healing.

Table I. Granulation Tissue Area and Thickness

	Granulation tissue(mean \pm standard deviation)	
	Area(pixels)	Thickness(pixels)
NT	$5.5 \times 10^5 \pm 5.3 \times 10^5$	$3.5 \times 10^2 \pm 3.6 \times 10^2$
1 h	$1.1 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$	$7.9 \times 10^2 \pm 3.9 \times 10^2$
24 h	$8.6 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^5$	$5.7 \times 10^2 \pm 2.5 \times 10^2$

*NT(untreated), 1 h(1 hour group), 24 h(24 hours group)

발생 후 제 10일을 상처치유의 staging을 위해 중간 지점으로 채택하였다. 내피세포를 염색하고 육아조직의 혈관 밀도를 정량화하기 위하여 PECAM-1(CD31)을 선택하였고 증식중인 세포는 Ki-67로 염색하였다(Fig. 3). 1시간 그룹은 NT 그룹, 24시간 그룹과 비교해서 혈관 밀도와 세포증식면에서 유의한 수준의 증가를 보였다. 치료방법들 간의 혈관생성과 증식효과를 시각화하기 위하여 PECAM-1과 Ki-67을 좌표에 표시하였다(Fig. 4). 새로 형성된 조직의 정도를 평가하기 위하여 육아조직의 면적과 두께를 측정하였다. 육아조직의 양과 분포는 1시간 그룹, 24시간 그룹, 그리고 NT 그룹 간에서 유의할만한 차이는 발견할 수 없었다(Table I).

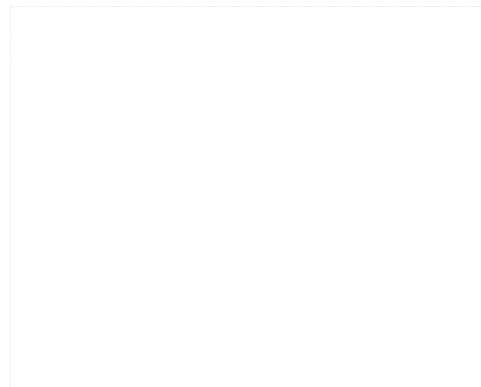


Fig. 4. The plot combines the quantification of the two immunohistochemical markers visually showing the difference between groups on study. The 1h group dramatically differed from both 24 h and NT groups. Mean values and standard deviations are shown. * $p < 0.01$.

IV. 고 찰

이 연구는 당뇨병 쥐를 대상으로 PGlcNAc 패치의 적용에 따른 상처 폐쇄와 상처치료의 변화를 살펴보기 위해 21일 동안 시행되었다. 당뇨병 쥐는 인간의 제 2형 당뇨병 연구를 위한 유용한 모델로서 비만, 고혈당, 인슐린 내성, 그리고 상처치료가 저해되는 것을 보여주며 당뇨 유병률과 당뇨 합병증이 꾸준히 증가함에 따라 많은 연구에서 사용되고 있다.

나노섬유는 섬유의 크기와 넓은 표면적으로 인해 상처부위에서 좋은 세포외기질(extracellular matrix)로 작용하여 새로운 조직의 성장을 촉진하고 높은 삼출액 흡수 능력을 가지므로 상처치유를 돕는다. PGlcNAc 패치의 상처치유 증진 효과는 혈소판의 활성화, 내피세포의 endothelin 방출, 제2형 VEGF(vascular endothelial growth factor) 수용기 경로 자극 등을 통해 이루어진다고 알려져 있다. 그 중에서도 혈소판 활성화의 증폭이 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 여겨지고 있다. 패치 섬유와 혈장 단백질로 구성된 복합체는 혈소판과 특이적으로 결합하여 혈소판을 활성화시키고 상처에 대한 생리 반응을 촉진시킨다. 활성화된 혈소판은 특히 오래된 상처에 효과가 있는 것으로 알려진, 성장인자가 풍부한 과립을 방출한다.^{10,13} 혈소판 농축액은 가공하고 저장하는 방법이 어려운데 반해 PGlcNAc 패치는 상대적으로 손쉽게 혈소판의 장점을 활용할 수 있는 효율적인 방법이다. 내피세포가 Poly-N-acetyl glucosamine을 담고 있는 나노섬유와 접하게 되면, 용량에 비례하여 강력한 마이토젠(mitogen) 이고 혈관수축효과가 있는 endothelin을 방출한다.^{14,15} PGlcNAc 패치를 1시간 동안 적용한 그룹에서 24시간 동안 적용한 그룹보다 더욱 활발한 신생혈관 형성과 세포증식이 유발되었고 결과적으로 더 빠른 상처 폐쇄가 이루어졌다. 이것은 24시간 동안 PGlcNAc 패치를 적용하는 것이 과도한 endothelin의 방출을 야기하고 신생 혈관 생성을 제한하는 과도한 혈관 수축을 야기할 수 있다고 추론할 수 있다. 패치의 긴 불용성 섬유가 상처의 심부조직에 21일간 존재하면 이물 반응을 유발하여 육아조직 형성을 촉진하고 결국 상처치유를 저해하였지만 1시간과 24시간 동안 패치를 적용한 그룹에서는 상처치유 반응이 촉진된 반면 육아 조직생성의 증가와 거대 다핵세포가 존재하지 않아 이물 반응은 야기되지 않음을 알 수 있었다.

현재 PGlcNAc 패치의 임상적 사용은 패치가 지닌 지혈 능력에 중점을 두고 있으나, 본 실험을 통하여 PGlcNAc 패치가 상처치유 반응의 질적 측면에서도 효

율적이라는 것을 확인할 수 있었다. 상처 주변 환경과 패치의 상호작용 양상을 파악하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

출혈을 야기하는 상처는 종종 단계적인 치료를 요하는데, VAC의 적용이나 피부이식과 같은 상처에 대한 특별한 치료는 안정적으로 지혈이 된 이후에 시행할 수 있으므로, 지혈과 치료 효과를 모두 지닌 PGlcNAc 패치는 상처치료에 좋은 도구로 사용될 수 있다.

REFERENCES

1. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M: Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* 294: 1255, 2005
2. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G: Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 366: 1725, 2005
3. Falanga V: Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366: 1736, 2005
4. Saxena V, Hwang CW, Huang S, Eichbaum Q, Ingber D, Orgill DP: Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg* 114: 1086, 2004
5. Greene AK, Puder M, Roy R, Arsenault D, Kwei S, Moses MA, Orgill DP: Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients. *Ann Plast Surg* 56: 418, 2006
6. Fazio VW, Cohen Z, Fleshman JW, van Goor H, Bauer JJ, Wolff BG, Cormann M, Beart RW Jr, Wexner SD, Becker JM, Monson JR, Kaufman HS, Beck DE, Bailey HR, Ludwig KA, Stamos MJ, Darzi A, Bleday R, Dorazio R, Madoff RD, Smith LE, Gearhart S, Lillemo K, Göhl J: Reduction in adhesive small-bowel obstruction by Seprafilm adhesion barrier after intestinal resection. *Dis Colon Rectum* 49: 1, 2006
7. Peña Ede L, Sala S, Rovira JC, Schmidt RF, Belmonte C: Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity *in vitro*. *Pain* 99: 501, 2002
8. Orgill DP, Straus FH 2nd, Lee RC: The use of collagen-GAG membranes in reconstructive surgery. *Ann N Y Acad Sci* 888: 233, 1999
9. Vournakis JN, Demcheva M, Whitson A, Guirca R, Pariser ER: Isolation, purification, and characterization of poly-N-acetyl glucosamine use as a hemostatic agent. *J Trauma* 57: S2, 2004
10. Valeri CR, Srey R, Tilahun D, Ragno G: *In vitro* effects of poly-N-acetyl glucosamine on the activation of platelets in platelet-rich plasma with and without red blood cells. *J Trauma* 57: S22, 2004
11. Thatté HS, Zagarins S, Khuri SF, Fischer TH: Mecha-

- nisms of poly-N-acetyl glucosamine polymer-mediated hemostasis: platelet interactions. *J Trauma* 57: S13, 2004
12. Thatte HS, Zagarins SE, Amiji M, Khuri SF: Poly-N-acetyl glucosamine-mediated red blood cell interactions. *J Trauma* 57: S7, 2004
 13. Pietramaggiori G, Kaipainen A, Czezug JM, Wagner CT, Orgill DP: Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 14: 573, 2006
 14. Ikeda Y, Young LH, Vournakis JN, Lefer AM: Vascular effects of poly-N-acetylglucosamine in isolated rat aortic rings. *J Surg Res* 102: 215, 2002
 15. Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER: Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 272: 17097, 1997